Union of Soviet Socialist Republics

State Committee on Inventions and Discoveries of the USSR Council of Ministers

PATENT SPECIFICATION
FOR AN INVENTOR'S CERTIFICATE

(61) Supplement to inventor's certificate –
(22) Application Date: 12/25/72 (21) 1864243/31-16
with inclusion of application No. –
(23) Priority –
Published 01/05/75. Bulletin No. 1
Date of specification publication: 02/20/75

(11) **455738**

(51) Int. Cl.
A 61k 23/02

(53) UDC 615.372
(088.8)

(72) Inventors V. M. Kolotov and R. A. Pshenichnov

(71) Applicant Institute of Plant and Animal Ecology

(54) METHOD OF OBTAINING DRY ERYTHROCYTE DIAGNOSTIC AGENT FOR IDENTIFICATION OF SPECIES-SPECIFIC ANTIGLOBULINS

The invention relates to methods of medical diagnostics.

A method is known for obtaining dry erythrocyte diagnostic agents by immunizing animals with microbial antigens with subsequent sorption of obtained immune serum using erythrocytes that have been fixed with acrolein and processed, for example, with tannin.

In order to enhance the specificity of the diagnostic agent, erythrocyte sorption is proposed by means of immunoglobulins taken from the sensitizing power zone and obtained by immunizing animals with heterogeneous erythrocytes.

The method of preparing the dry erythrocyte diagnostic agent for the identification of species-specific antiglobulins is implemented as follows. The required quantity of blood, the erythrocytes of which are used to immunize an animal, is drawn into a sterile flask containing glass (metal) beads and defibrinated by agitation for 15 min. The defibrinated blood is separated from the fibrin clot by filtering it through three layers of gauze fabric and centrifuging for 15 min, after which it is separated into two layers: an upper, serous layer that is decanted and discarded, and a lower layer of blood corpuscles (primarily erythrocytes).

The erythrocyte residue is rinsed three times with a 10-fold volume of saline solution via centrifuging (at 2000 rpm for 15 min), after which it is fixed with acrylic aldehyde (acrolein). This is done by adding the fixing agent (acrolein in saline solution) in a 1:20 proportion to the weighed erythrocyte residue. Here, the acrolein concentration for mammalian erythrocytes (monkeys, horses, bulls, sheep, dogs, goats, cats, rabbits, guinea pigs, white rats, white mice, etc.) and for human erythrocytes is 0.4%, with a 30 min exposure time at room temperature. Erythrocytes from birds (chickens, geese, pigeons) are fixed using a 0.3% acrolein solution for 20 min at room temperature.

After fixing, the erythrocyte residue is washed three times with 10-fold volumes of saline solution via centrifuging (at 2000 rpm for 3 min) in order to remove the acrolein.

The fixed and washed erythrocytes may be stored in a refrigerator (at a temperature of +4°C) in the form of a 10% suspension in saline solution or may be freeze dried.

Animals whose serum globulin is to undergo erythrocyte sorption are immunized in a cycle consisting of three injections administered at two-day intervals. The dose of erythrocyte residue per injection is 0.5 ml per kilogram of animal weight when administered intravenously. Prior to each injection, the required quantity of liquid (10%) erythrocytes are separated by centrifuging, and then resuspended in sterile saline solution in a 1:3 proportion. When dry erythrocytes are used for immunization, the required quantity of ampoules is dissolved in sterile saline solution in the same proportion.

Between five and seven days after the final injection, 2–3 ml of blood are drawn from the animal, the serum of which is titrated (two-fold di-

BEST AVAILABLE COPY

A N2

lution from 1:20 to 1:10240 in a 0.5 ml volume) with a 0.5% suspension of fixed (rehydrated dry) erythrocytes that are the same as those administered (0.5 ml each). If such erythrocytes are not available, they may be replaced with erythrocytes from another animal or bird species. A hemagglutinating titer value of 1:320 or higher indicates that the obtained serum is of sufficiently high potency. A massive blood draw is then performed on the same animal and the blood serum is dispensed into sterile 0.5–1.0 ml ampoules that are freeze dried under serum product conditions.

The hemagglutinating titer of the dried serum containing erythrocytes that form the cellular basis for the future product is determined prior to preparing the erythrocyte species-specific globulin diagnostic agent. The working dose for sensibilization of erythrocytes is the second and third dilution, following the hemagglutinating titer, of serum in which the erythrocytes no longer agglutinate. A mixture is prepared comprising the required quantity of erythrocytes in the form of their 2% suspension in saline solution and an equal volume of serum taken in a concentration that corresponds to the second dilution following the hemagglutinating titer. The mixture is held at a temperature of 37°C for 30 min, after which the erythrocytes are separated by centrifuging and washed once with a 10-fold volume of saline solution.

The resulting residue of globulin-sensibilitized erythrocytes is suspended in a sucrose–protein filler (15% sucrose and 30% beef-extract broth or any proven standard protein blood substitute in distilled water) in a concentration of up to 50%, and the resulting suspension is dispensed in quantities of 1 ml into 6-ml ampoules. After vigorous agitation, the ampoules are frozen at a temperature of -50°C, are freeze dried in accordance with conditions for drying serum products, and sealed.

Prior to use, the product ampoule is opened and the contents are dissolved in 10 ml of saline solution, thereby obtaining a 0.5% working suspension of diagnostic agent.

Patent claim

A method for obtaining dry erythrocyte diagnostic agent for identification of species-specific antiglobulins by sorption of immunoglobulins using acrolein-fixed erythrocytes with subsequent freeze drying, is distinguished, for the purpose of enhancing the specificity of the diagnostic agent, by erythrocyte sorption of immunoglobulins taken from the sensitizing power zone and obtained by immunizing animals with heterogeneous erythrocytes.

Originator: S. Malyutina
Editor: T. Karanova Technical Editor: A. Kamyshnikova Proofreader: N. Lebedeva
Order 625/1 Publ. No. 275 Pressrun 559 By subscription
All-Union Scientific-Research Institute of Patent Information,
State Committee on Inventions and Discoveries, USSR Council of Ministers
No. 4/5 Raushskaya Nab., Moscow, Zh-35
Printing Office, No. 2 Sapunova Prospekt

BEST AVAILABLE COPY

Союз Советских Социалистических Республик

Государственный комитет Совета Министров СССР по делам изобретений и открытий

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ
К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 455738

(61) Зависимое от авт. свидетельства —

(22) Заявлено 25.12.72 (21) 1864243/31-16

с присоединением заявки № —

(32) Приоритет —

Опубликовано 05.01.75. Бюллетень № 1

Дата опубликования описания 20.02.75

(51) М. Кл. A 61k 23/02

(53) УДК 615.372(088.8)

(72) Авторы изобретения: В. М. Колотов и Р. А. Пшеничнов

(71) Заявитель: Институт экологии растений и животных

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЭРИТРОЦИТАРНОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЛОБУЛИНОВ

1

Изобретение относится к методам медицинской диагностики.

Известен способ получения сухих эритроцитарных диагностикумов путем иммунизации животных микробными антигенами с последующей сорбцией полученной иммунной сыворотки на эритроцитах, фиксированных акролеином и обработанных например, танином.

Для повышения специфичности диагностикума предлагается на эритроцитах сорбировать взятые в зоне сенсибилизирующей активности иммуноглобулины, полученные при иммунизации животных гетерогенными эритроцитами.

Способ приготовления сухого эритроцитарного диагностикума для выявления видоспецифических антиглобулинов осуществляют следующим образом. Кровь, эритроциты которой используют для иммунизации животного, забирают в необходимом количестве в стерильный флакон со стеклянными (металлическими) бусами и дефибринируют встряхиванием в течение 15 мин. Дефибринированную кровь отделяют от сгустка фибрина фильтрованием через три слоя марли и центрифугированием в течение 15 мин, разделяют на два слоя: верхний — сывороточный, который декантируется и выбрасывается, и нижний — форменные элементы крови (в основном, эритроциты).

2

Эритроцитарный осадок трижды промывают 10-кратными объемами физиологического раствора центрифугированием (при 2000 об/мин в течение 15 мин), а затем фиксируют акриловым альдегидом (акролеином). Для этого к измеренному осадку эритроцитов добавляют фиксатор (акролеин на физиологическом растворе) в соотношении 1 : 20. Концентрация акролеина при этом составляет для эритроцитов млекопитающих (обезьяны, лошади, быка, барана, собаки, козы, кошки, кролика, морских свинок, белых крыс, белых мышей и др.) и человека — 0,4% с экспозицией в 30 мин при комнатной температуре. Эритроциты птиц (кур, гусей, голубей) фиксируются 0,3%-ным раствором акролеина в течение 20 мин при комнатной температуре.

После фиксации эритроцитарный осадок трижды отмывается от акролеина 10-кратными растворами физиологического раствора (при 2000 об/мин по 3 мин).

Зафиксированные и отмытые эритроциты могут храниться в рефрижераторе (при температуре + 4°С) в виде 10%-ной взвеси на физиологическом растворе или подвергаться лиофильному высушиванию.

Иммунизацию животных, сывороточные глобулины которых предполагается сорбировать на эритроцитах, проводят циклом, состоящим из трех инъекций с интервалом двое су-

BEST AVAILABLE COPY

ток. Доза осадка эритроцитов на одну инъекцию составляет 0,5 мл на 1 кг веса животного при внутривенном введении. Перед каждой инъекцией необходимое количество жидких (10%) эритроцитов осаждается центрифугированием, а затем ресуспендируется в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1 : 3. При использовании для иммунизации сухих эритроцитов необходимое количество ампул разводят в таком же соотношении стерильным физиологическим раствором.

На пятый—седьмой день после заключительной инъекции у животного забирают 2—3 мл крови, сыворотка которой титруется (двукратное разведение с 1 : 20 до 1 : 10240 в объеме 0,5 мл) 0,5%-ной взвесью фиксированных (регидратированных сухих) одноименных с вводимыми эритроцитов (по 0,5 мл). При отсутствии таких эритроцитов они могут быть заменены эритроцитами другого вида животного или птицы. Величина гемагглютинирующего титра 1 : 320 и выше является показателем достаточно высокой активности полученной сыворотки. Затем проводят массивный забор крови у этого животного, сыворотку крови разливают в стерильные ампулы по 0,5—1 мл и лиофильно высушивают по режиму сывороточных препаратов.

Перед приготовлением эритроцитарного видоспецифического глобулинового диагностикума определяется гемагглютинирующий титр высушенной сыворотки с эритроцитами, которые составят клеточную основу будущего препарата. Рабочей дозой для сенсибилизации эритроцитов является следующие за гемагглютинирующим титром второе—третье разведения сыворотки, в которых эритроциты уже не агглютинируют. Готовят смесь, состоящую из необходимого количества эритроцитов в виде 2%-ной взвеси их на физиологическом растворе и равного объема сыворотки, взятой в концентрации, соответствующей второму за гемагглютинирующим титром разведению. Смесь выдерживают при температуре 37°С в течение 30 мин, после чего эритроциты осаждают центрифугированием и один раз отмывают 10-кратным объемом физиологического раствора.

Полученный осадок сенсибилизированных глобулинами эритроцитов взвешивают в сахарозо-белковом наполнителе (сахарозы 15%, мясопептонного бульона или любого из испытанных стандартных белковых кровезаменителей — желатиноля, протеина, казеина — 30% на дистиллированной воде) до 50%-ной концентрации, и полученную взвесь разливают в 6-миллилитровые ампулы по 1 мл. Ампулы после энергичного встряхивания замораживают при температуре — 50°С, лиофильно высушивают по режиму сушки сывороточных препаратов и запаивают.

Перед использованием ампулу с препаратом вскрывают, содержимое разводят в 10 мл физиологического раствора с получением 0,5% рабочей взвеси диагностикума.

Предмет изобретения

Способ получения сухого эритроцитарного диагностикума для выявления видоспецифических антиглобулинов путем сорбции иммуноглобулинов на фиксированных акролеином эритроцитах с последующей лиофилизацией, отличающийся тем, что, с целью повышения специфичности диагностикума, на эритроцитах сорбируют взятые в зоне сенсибилизирующей активности иммуноглобулины, полученные при иммунизации животных гетерогенными эритроцитами.

Составитель С. Малютина

Редактор Т. Каранова Техред А. Камышникова Корректор Н. Лебедева

Заказ 625/1 Изд. № 275 Тираж 559 Подписное

ЦНИИПИ Государственного комитета Совета Министров СССР
по делам изобретений и открытий
Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Типография, пр. Сапунова, 2

BEST AVAILABLE COPY